

## Expertos Invitados

### **BACTERIOTERAPIA CON LACTOBACILOS PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES UROGENITALES**



Columnista Experta de SIIC  
**Dra. María Elena Nader-Macías**

Doctor en Bioquímica. Vice-Director de CERELA; Investigador Principal del CONICET; Profesor Asociado de Microbiología de la UNSTA, San Miguel de Tucumán, Argentina

La terapia con probióticos se emplea cada vez con mayor frecuencia para la prevención y terapéutica de diversas infecciones y síndromes clínicos que afectan principalmente el tracto gastrointestinal. El término probióticos implica la administración de microorganismos vivos en número suficiente para ejercer un efecto fisiológico benéfico en el huésped, definición consensuada en la reunión de expertos de ISAPP.<sup>1</sup> En los últimos años se vio una verdadera explosión de publicaciones en esta área puntual de investigación, como metaanálisis y revisiones que sintetizan el efecto benéfico de los probióticos en las diarreas asociadas a antibióticos,<sup>2</sup> del viajero y por rotavirus,<sup>3</sup> y resultados positivos pero no definitivos sobre la administración de probióticos para la enfermedad de Crohn<sup>4</sup> o en alergias atópicas.<sup>5</sup>

Al mismo tiempo, en el mercado alimentario se incrementó la disponibilidad de una muy extensa gama y variedad de productos probióticos y alimentos funcionales elaborados por empresas internacionales o regionales que proclaman una serie de efectos benéficos sobre el huésped, algunas veces no demostrados en ensayos clínicos.

Si bien el concepto de reconstitución de la microbiota indígena se estudió en profundidad, y se demostró su efectividad en el tracto gastrointestinal,<sup>6-8</sup> este concepto se traslada al restablecimiento del equilibrio ecológico del tracto urogenital para participar así en la prevención de infecciones. Las infecciones que afectan este tracto incluyen aquellas de transmisión sexual (sífilis, gonorrea, HIV, etc.) como las que se producen como consecuencia del ascenso de la microflora perineal, influidas tanto por factores exógenos (tratamientos hormonales, antibioticoterapias, inmunosupresores) como endógenos (embarazo, menarca, inmunodeficiencias primarias). La incidencia de cada una de ellos es significativa porque producen desde esterilidad hasta distintos efectos sobre la salud, tanto de la mujer embarazada como del feto. Asimismo, es cada vez mayor el número de mujeres que sufren infecciones del tracto urinario (UTI) a lo largo de su vida, o bien en la etapa prepuberal o posmenopáusica.

Sobre la base de los antecedentes descritos, nuestro grupo comenzó a investigar sobre la posibilidad de emplear la bacterioterapia con BAL para la prevención y tratamiento de infecciones urogenitales. Debido a que existe una especificidad de huésped en muchos de los componentes de la microbiota indígena,<sup>9</sup> nos dedicamos a aislar y seleccionar lactobacilos vaginales de origen humano que pudieran ser empleados para la prevención de infecciones urogenitales como una alternativa válida para el empleo de antibióticos, antimicóticos y/o antiparasitarios, que producen efectos adversos y depleción de la microbiota indígena con las consecuencias concomitantes. Una vez aislados los lactobacilos de vagina de mujeres de nuestro medio realizamos el relevamiento de sus propiedades benéficas o probióticas que permitieran su empleo como reconstituyentes de la microbiota indígena y prevención de infecciones.<sup>10</sup> Se seleccionaron aquellos microorganismos con una superficie hidrofóbica que les permitiera una mejor adherencia a la membrana de las células epiteliales, o bien a la capa de glucoproteínas mucosas que las recubre, que varía según el estadio

del ciclo hormonal. Luego, se seleccionaron los lactobacilos que pudieran producir grandes cantidades de sustancias antagónicas frente a patógenos urogenitales: ácidos orgánicos (por ej. ácido láctico), peróxido de hidrógeno o bacteriocinas.<sup>11-14</sup> La capacidad de producir peróxido de hidrógeno se empleó como característica determinante de selección, en base a algunos trabajos publicados en los que se demuestra que pacientes normales tienen prevalencia de lactobacilos  $H_2O_2^+$  en vagina, mientras que esta población está deplecionada o disminuida en pacientes con síndromes infecciosos.<sup>15-17</sup> La propiedad de producir bacteriocinas en lactobacilos vaginales no fue publicada previamente, por lo que la descripción de *Lactobacillus salivarius*, productor de una bacteriocina termoestable que inhibe varios patógenos genitales<sup>13</sup> fue uno de los hallazgos más interesantes de nuestro grupo. Ello nos permitiría combinar bacterias vivas con sustancias inhibitoras para su aplicación en el diseño de un producto farmacéutico.

Debido a que todo producto a ser aplicado en seres humanos debe ser probado en animales de experimentación, se trabajó en la implementación de un modelo experimental murino para estudiar la capacidad de colonización de lactobacilos al ser inoculados intrauretralmente. Así, determinamos que en ratones hembra adultas (cepa BALB/c) de dos meses de edad, la dosis óptima debía ser de alrededor de  $10^7$  células viables durante tres días para colonizar el tracto urinario, los que permanecían en el tracto hasta el día 7 posinoculación.<sup>18-20</sup> Debían ser reinoculadas para lograr un tiempo más largo de colonización. Demostramos que no producen efectos adversos o colaterales en ninguno de los órganos del tracto urinario, ni modificaciones estructurales o ultraestructurales.<sup>21</sup> Son capaces de prevenir la infección por *Escherichia coli* uropatógeno, en mayor grado si son aplicados preventivamente que terapéuticamente.<sup>22</sup> Y si se administran junto con antibióticos<sup>22</sup> o con hormonas<sup>23</sup> la respuesta frente al patógeno es más intensa, ya que *E. coli* desaparece del tracto más rápidamente y sin producir un efecto tan agresivo en el huésped. Por otra parte, la administración intravaginal de lactobacilos no produce modificaciones histológicas al ser administrados en el modelo experimental murino.<sup>24</sup>

El disponer de una serie de lactobacilos probióticos o benéficos implica además el estudio de sus propiedades tecnológicas para su inclusión en un producto de aplicación vaginal. Un producto efectivo para recolonizar el tracto vaginal, de aplicación local, debe contener microorganismos vivos en número no inferior a  $10^7$  bacterias, lo que implica obtener una gran cantidad de biomasa microbiana. Para ello se evaluaron los medios de cultivo y condiciones físico-químicas óptimas que permitieran un mayor rendimiento microbiano,<sup>25</sup> como la liofilización en presencia de diferentes componentes y excipientes de productos farmacéuticos,<sup>26-28</sup> para lograr una vida de estante extendida del producto. Por otra parte, se evaluaron las condiciones óptimas de producción de sustancias antagónicas para diseñar productos combinados conteniendo al mismo tiempo bacterias vivas y sustancias inhibitoras de patógenos.<sup>29-32</sup> Así, se determinó que las condiciones óptimas de producción de bacteriocina de *L. salivarius* son similares a las condiciones de crecimiento.<sup>30</sup> Mientras que las condiciones óptimas de producción de peróxido de hidrógeno y de autoagregación son diferentes de las de crecimiento, ya que el metabolito oxidante se produce en mayores concentraciones en agitación, situación en la que inhibe más efectivamente *S. aureus*, microorganismo responsable del síndrome del shock tóxico en usuarias de tampones.<sup>31,32</sup> Las concentraciones e isómeros de ácido láctico producido por los lactobacilos son diferentes según las condiciones de crecimiento, como la capacidad de autoaglutinar.<sup>32</sup>

Los resultados de nuestro grupo permitieron la selección de lactobacilos probióticos (resumidos en la tabla 1) con características benéficas que incluyen: capacidad de adherencia a epitelios y mucosas, producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, autoagregación, y sin producir efectos adversos en el modelo animal murino. Estos microorganismos podrán ser incluidos en un producto farmacéutico de aplicación local para la prevención de infecciones urogenitales.

Tabla 1. Lactobacilos vaginales seleccionados por sus características probióticas.

Microorganismo	CRL	Característica Probiótica
<i>L. acidophilus</i>	1266	Productor de $H_2O_2$
<i>L. paracasei</i> ss. <i>paracasei</i>	1289	Productor de $H_2O_2$
<i>L. johnsonii</i>	1294	Auto y co-agregante
<i>L. salivarius</i> ss. <i>salivarius</i>	1328	Productor de Bacteriocina
<i>L. gasseri</i>	1259	Productor de Acido Láctico

La aplicación clínica de estos productos y su efectividad recién se encuentran en su etapa inicial,

con escasas publicaciones en el tema. Si bien este tipo de productos están disponibles en el mercado farmacéutico mundial, no se publicaron las características de los microorganismos ni los efectos beneficiosos o detrimentales en el huésped, con algunas escasas excepciones. El grupo de Reid y col., en Canadá, demostró la efectividad y las propiedades de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* en la prevención de las infecciones urinarias y en vaginosis bacterianas.<sup>33-36</sup> Otros investigadores están estudiando y realizando ensayos clínicos para evaluar la efectividad de diferentes microorganismos ante la vaginosis bacteriana.<sup>37-47</sup>

Los pocos ensayos clínicos publicados dan idea de la promisorio efectividad de la prevención y tratamiento de algunos síndromes específicos por cepas específicas de lactobacilos, lo que sería óptimo para evitar las terapias antimicrobianas con sus concomitantes efectos adversos sobre la salud del huésped.

Las posibilidades de investigación en esta área puntual son amplísimas, básicamente por la característica GRAS de los lactobacilos, lo que permite en teoría su administración sin que sean sujeto de control de determinadas agencias. Pero es necesario profundizar en el conocimiento de los efectos de la administración prolongada de lactobacilos en el tracto urogenital, si es que producen algún tipo de efecto adverso, si tienen algún efecto sobre los parámetros de alta calidad de vida que se emplean como marcadores poblacionales, cuál es el efecto que producen en la mujer embarazada, en qué momento hay que administrarlos, cuál es la dosis y el tiempo óptimos de administración, etc.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés".

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reid G, Sanders ME, Gaskins R et al. New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2003; 37: 108-118.
2. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC et al. Metaanalysis: The effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1461-1467.
3. Szajewska H, Mrukowics JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double blind, placebo controlled trials. *J Pediatr Gastroentl Nutr* 2001; 33(Supl2):S17-25.
4. Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 44-50.
5. Weston S, Halbert AR, Richmond P, Prescott SL. Effect of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 2005; 29.
6. Gill HS, Guarner F. Probiotics and humal health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 2004; 80: 516-526.
7. Sullivan A, Nord CE. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J Intern Med* 2005; 257: 78-92.
8. De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 405-411.
9. Savage DC, Kotarski SF. Models for study the specificity by which lactobacilli adhere to murine gastric epithelium. *Inf and Immun* 1979; 26: 966-973.
10. Ocaña VS, Bru E, De Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol* 1999; 45: 203-12.
11. Ocaña VS, De Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Selection of vaginal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacillus* for probiotic use. *Current Microbiol* 1999; 38: 279-84.
12. Ocaña VS, De Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23: 87-92.
13. Ocaña VS, De Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl Env Microbiol* 1999; 65: 5631-35.
14. Juárez Tomas MS, Ocaña VS, Wiese B, Nader-Macías ME. Growth and Lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Of Medical Microbiology* 2003; 52: 1117-1124.
15. Hillier SL, Krhnh MA, Rabe LK, Klebanoff S, Eschenbach D. The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Inf Diseases* 1993; 16(S4): S273-281.
16. Redondo-López V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 856-872.
17. Esenbach Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorph AM. Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating lactobacilli. *J Inf Dis* 1991; 164: 94-100.
18. Nader Macías ME, López Bocanera ME, Silva Ruiz C, Pesce de Ruiz Holgado A. Isolation of lactobacilli from the urogenital tract of mice. Elaboration of beads for their inoculation. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 1992; 10: 43-7.
19. Silva Ruiz C, Nader-Macías ME, López Bocanera ME, Ruiz Holgado A. *Lactobacillus fermentum* administered in suspensions and in agarose beads to mice: a comparative study. *Microbiologie Aliments Nutrition* 1993; 11: 391-397.
20. Nader-Macías ME, Silva-Ruiz C, López-Bocanera ME, Pesce-Ruiz Holgado A. Behaviour of lactobacilli on prevention and therapeutic effects on urinary tract infections (UTI) in mice. *Anaerobe* 1996; 2: 85-93.

21. Silva de Ruiz C, Rey R, Nader-Macías ME. Structural and ultrastructural studies of the urinary tract of mice inoculated with *Lactobacillus fermentum*. *British Journal of Urology* 2003; 91:878-882.
22. Silva Ruiz C, Lopez Bocanera ME, Nader Macías ME, Pesce de Ruiz Holgado A. Effect of lactobacilli and antibiotics on *E. coli* urinary tract infections in mice. *Biol Pharmac Bull* 1996; 19(1):88-93.
23. Silva Ruiz C, Rey R, Nader Macías ME. Experimental administration of estradiol on the colonization of *Lactobacillus fermentum* and *Escherichia coli* in the urogenital tract of mice. *Bio Pharm Bull* 2001; 24:127-134.
24. Vintini E; Ocaña V, Nader-Macias ME. Effect of lactobacilli administration in the vaginal tract of mice: evaluation of side effects and local immune response by local administration of selected strains. *Methods Mol Biol* 2004; 268:401-410.
25. Juárez Tomás MS, Bru de Labanda E, de Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Estimation of vaginal probiotic lactobacilli growth parameters with the application of the Gompertz model. *Can J Microbiol* 2002; 48:82-92.
26. Juárez Tomás MS, Ocaña V, Nader-Macias ME. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe* 2004; 10:1-5.
27. Zárate G, Juárez Tomas MS, Nader-Macias ME. Effect of some pharmaceutical excipiente on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. (2005) In press.
28. Zárate G, Nader-Macias. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. (2005) In press.
29. Juárez Tomás MS, Bru E, Nader-Macias ME. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:35-44.
30. Juárez Tomás MS, Bru E, Wiese B, de Ruiz Holgado AAP, Nader-Macías ME. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production of vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J Appl Microbiol* 2002; 93(4):714-724.
31. Ocaña VS, Nader-Macias ME. Vaginal Lactobacilli: self and co-aggregating ability. *British Journal of Biomedical Sciences* 2002; 59:183-190.
32. Juárez Tomás MS, Wiese B, Nader-Macias ME. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. (2005) In press.
33. Reid G, Bruce A, Taylor M. Influence of three days antimicrobial therapy and Lactobacilli vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections. *Clin Therap* 1992; 14:11-16.
34. Baerheim S, Larsen E, Di Granes A. Vaginal application of lactobacilli in the prophylaxis of recurrent lower urinary tract infections in women. *Scand J Prim Health Care* 1994; 12:239-242.
35. Raz R, Stamm W. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *New Eng J of Medicine* 1993; 329:753-756.
36. Parent J, Bossens M, Bayot D, et al. Therapy of bacterial vaginosis using exogenously applied lactobacillus acidophilus and a low dose of estriol. *Drug Res* 1996; 46:68-73.
37. Mc Groarty J. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Microb and Medical Microbiology* 1993; 6:251-264.
38. Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 2002; 4:319-324.
39. Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens *Microbes and Infection* 2000; 2:543-546.
40. Reid G, Bruce AW. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* 2001; 183(Suppl 1):S77-80.
41. Reid G, Jass J, Sebulsky T, McCormick J. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4):658-72.
42. Reid G, Beurman D, Heinemann C, Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 32:37-41.
43. Reid G, Bruce AW. Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* 2001; 183(suppl 1):S77-S80.
44. Gardiner G, Heinemann C, Beurman D, Bruce AW, Reid G. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *L. rhamnosus* GR-1, but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:92-96.
45. Reid G, Cook RL, Bruce AW. Examination of strains of lactobacilli for properties which may influence bacterial interference in the urinary tract. *J Urol* 1987; 138:330-335.
46. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(suppl):437S-443S.
47. Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beurman D, Poehner R, Bruce AW. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 35:131-134.